植 物 分 类 学 报 31(4): 329— 352 (1993)
Acta phytotaxonomica Sinica

应用同工酶进行柑桔分类和进化研究 *

方德秋　　章文才　肖顺元
(中国科学院武汉植物研究所，武昌 430074)　(华中农业大学柑桔研究室，武昌 430070)

STUDIES ON TAXONOMY AND EVOLUTION OF *CITRUS* AND ITS RELATED GENERA BY ISOZYME ANALYSIS

FANG DE-QIU　　ZHANG WEN-CAI　XIAO SHUN-YUAN
(*Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan* 430074)　(*Citrus Research Institute of Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070)

Abstract The leaf or bark tissue extracts of 108 biotypes of *Citrus* and its five related genera were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis for isozymes of peroxidase, glutamate oxaloacetate transaminase, phosphoglucose isomerase, phosphoglucose mutase, superoxide dismutase, tetrazolium oxidase, $NADP^+$-dependent malate dehydrogenase and esterase. The inter- or intra-generic differences of isozymograms were compared. Dissimilarities of the isozyme patterns among the samples were calculated by computer based on the UPGMA method to demonstrate the phylogenetic relationship of the biotypes. There are remarkable isozymogramatic differences among the six genera. Generally speaking, each genus possesses its own unique bands. Based on the cluster analysis, the total *Citrus* biotypes are classified into seven groups, i.e. Honghe papeda, Mauritius papeda, Pummelo, Ichang papeda, Citron, Lemon-lime and Mandarin — orange. Ichang papeda is suggested to be the third subgenus of the genus *Citrus*. The Fuming trifoliata orange is accepted as a new species of *Poncirus* — *P. polyandra* S. Q. Ding. It might be the evolutionary bridge between *Poncirus* and *Citrus*, and one of the "missing links" as suggested by W. T. Swingle. Microacrumen (small-fruited mandarin) is the primitive form of the mandarins. It seems better to consider "Horse-nose mandarin "or" Xipigoushigan mandarin" as the typic mandarin

* 国家自然科学基金资助项目。
承蒙中国农业科学院柑桔研究所提供试材。该所的陈竹生、聂华堂、陈全友、郭天池先生给予了极大支持，在此谨致谢忱!
1991-01-25 收稿，1991-05-06 收到修改稿。

originated in China. Euacrumen (large-fruited mandarin) might have arised through two ways. One is hybridization of Microacrumen and *C. sinensis*, and the other is just the variation of Microacrumen. Ancestors of some biotypes are inferred based on isozyme data. *Fortunella obovata* Tan. may be a hybrid of *Fortunella* and *Citrus*. *C. unshiu* Marc. arose from the nucellar mutation of "Huangyanbendiguangju mandarin" (*C. nobilis* Lour.) in Huangyan of Zhejiang Province. *C. junos* Sieb. came from hybridization of Ichang papeda and mandarin. *C. grandis* Osbeck and mandarin may have been involved in the origin of *C. aurantium* L.. *C. limonia* Osbeck may be a hybrid between *C. medica* L. and mandarin. The evolutionary trend of citrus fruit trees is proposed, and a tentative phylogenetic diagram is drawn.
Key words Citrus; Isozymes; Taxonomy, Phylogeny; Cluster analysis

摘要 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法，分析了柑桔属及其5个近缘属108个生物型的过氧化物酶、谷氨酸草酰乙酸转氨酶、四唑氧化酶、6－磷酸葡萄糖异构酶、6－磷酸葡萄糖变位酶、超氧化物歧化酶、苹果酸酶以及酯酶等8种酶系统同工酶。比较了属间、种间的酶谱差异。运用数量分类学的原理及方法，对柑桔属、金柑属、枳属的同工酶资料进行了相异性类平均聚类分析。结果表明，6属之间，酶谱差异十分明显，各属都有独特的酶带。根据同工酶及形态分析结果，提出将柑桔属分为大翼橙亚属、宜昌橙亚属和柑桔亚属共包含七大类的观点。富民枳可作为枳属一新种看待，它是联结枳属与柑桔属的桥梁。小果类桔是宽皮柑桔的原生类型；中国原产宽皮柑桔的代表以马鼻桔或细皮狗屎柑为佳。柑的来源有两条途径，即桔与甜橙的杂种以及桔的单元演化。依据同工酶研究结果，认为长寿金柑是金柑属与柑桔属的属间杂种；温州蜜柑来源于黄岩本地广桔的实生变异；香橙系宽皮桔与宜昌橙的杂种；酸橙则可能是柚与宽皮柑桔的杂交后代；枸橼和宽皮柑桔参与了红檬檬的起源。最后推测了柑桔类植物的系统发育趋势，初步绘出了演化图。
关键词 柑桔；同工酶；分类；进化；聚类分析

珠心胚现象、种属间易于杂交以及无性变异容易发生等原因，使得柑桔分类及其进化研究十分困难。长期以来，学术界一直在进行激烈的争论(俞德俊 1979; Singh 等 1969; Swingle 1967; Tanaka 1977)。目前最有影响的是Swingle (1967)的大种分类和田中长三郎(1977)的小种分类两大系统。前者把柑桔属分为16个种，而后者则分为162个种。此外，其它学者也从形态的角度出发，对柑桔分类进行了研究，提出了一些见解，如Singh 把柑桔属分为31个种(Singh 等 1969)；曾勉(1960)则分为5个新属；Barrett 等认为柑桔属只有三个基本种，其余的皆是杂种或后生变异类型(Barrett & Rhodes 1976)。近十多年来，众多研究者又分别从孢粉学(叶荫民等1982)、细胞学(梁国鲁1990)、以及数量分类学(朱立武 1988; Handa & Oogaki 1985)等方面进行了柑桔分类研究，提出了一些新观点。

中国是柑桔起源中心之一，品种繁多，野生资源极为丰富。但迄今，国内有关柑桔数量化学(同工酶)分类的研究却不多见，研究工作也比较零碎。有鉴于此，本研究的目的在于综合分析中国柑桔属及其5个近缘属植物的8种酶系统同工酶，并对同工酶资料进行相异性类平均聚类分析，试图比较属种间的亲缘关系及柑桔类植物的系统发育

趋势。

材　料　与　方　法

(一)材料

大部分材料采自中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔资源圃(重庆北碚)，余下的则采自华中农业大学柑桔园。试材包括 108 个生物型，6 个属。试材名称见表 1。

表1　本试验所用试材

Table 1 Appendix Table　List of materials used in this experiment

编号 Code	中文名 Chinese name	英文名 Common name	学名* Scientific name	标本号** Voucher number
1	九里香	Orange jassamine	*Murraya paniculata* Jack.	LB3
2	酒饼勒	Chinese box orange	*Atalantia buxifolia* Oliv.	LB6
3	澳洲指桔	Australian wild lime	*Microcitrus australasica* Swingle	LB5
4	富民枳	Fuming trifoliate orange (TO)	*Poncirus polyandra* S.Q. Ding	121 丁素琴，存云南园艺研究所
5	飞龙枳	Flying dragon TO	*P. trifoliata* var. *monstrosa* Swingle	LT83
6	矮化枳	Dwarf TO	*P. trifoliata* Raf.	0045**
7	小叶大花枳	Small-leaf & large-flower TO	〃	LT75
8	大叶小花枳	Large-leaf & small-flower TO	〃	LT2
9	大叶大花枳	Large-leaf & large-flower TO	〃	LT112
10	小叶小花枳	Small-leaf & small-flower TO	〃	LT113
11	山金柑	Hongkong kumquat	*Fortunella hindsii* Swingle	LF11
12	罗纹	Round kumquat	*F. japonica* Swingle	LF1
13	罗浮	Oval kumquat	*F. margarita* Swingle	LF2
14	遂川金弹	Meiwa kumquat	(*F. crassifolia* Swingle)	0051**
15	长寿金柑	Changshou kumquat	(*F. obovata* Tan.)	LF10
16	四季桔	Calamondin	(*Citrus madurensis* Lour.)	0053**
17	红河橙	Honghe papeda	*C. hongheensis* Y. L. D. L.	LP8
18	马蜂柑	Mauritius papeda	*C. hystrix* D. C.	LP9
19	华农宜昌橙	Huanong Ichang papeda (IP)	*C. ichangensis* Swingle	0055**
20	白花宜昌橙	White-flower IP	〃	0056**
21	小叶宜昌橙	Small-leaf IP	〃	0058**
22	大叶宜昌橙	Large-leaf IP	〃	0060**
23	小香橼	Etrog citron	*C. medica* var.*etrog* Swingle	0072**
24	枸橼	Citron	*C. medica* L.	LM29
25	佛手	Fingered citron	*C. medica* var. *sarcodactylis* Swingle	LM19
26	红檸檬	Red lemon	(*C. limonia* Osbeck)	LM2
27	尤力克柠檬	Eureka lemon	*C. limon* (L.) Burm.	LM25
28	粗柠檬	Rough lemon	(*C. jambhiri* Osbeck)	LM24
29	北京柠檬	Meyer lemon	(*C. meyerii* Tan.)	LM126
30	广西土柠檬	Guangxi local lemon	*C. limon* (L.) Burm.	LM32
31	墨西哥来檬	Mexican lime	*C. aurantifolia* Swingle	LM53
32	科塞来檬	Kusuie lime	〃	LM143
33	马甘柠檬	Margan lemon	*C. limon* (L.) Burm	LM23

续表1

编号 Code	中文名 Chinese name	英文名 Common name	学名* Scientific name	标本号** Voucher number
34	兰卜来檬	Rangpur lime	(*C. limonia* Osbeck)	LM1
35	三宝柑	Sanbokan	(*C. sulcata* Tan.)	LG133
36	沙田柚	Shatian pummelo	*C. grandis* Osbeck	LG16
37	四季抛	Shikipao pummelo	〃	LG1
38	夔 柑	Kuikan pummelo	〃	LG157
39	金香柚	Jingxiang pummelo	〃	0075**
40	垫江红心柚	Dianjiang pummelo	〃	LG8
41	凤凰柚	Pheonix pummelo	〃	0076**
42	梁平柚	Liangping pummelo	〃	LG5
43	马叙葡萄柚	Marsh grapefruit	*C. paradisi* Macf.	LG104
44	伏令夏橙	Valencia sweet orange (SO)	*C. sinensis* Osbeck	0082**
45	锦 橙	Jincheng SO	*C. sinensis* osbeck	0085**
46	路比血橙	Ruby blood SO	〃	LS39
47	华盛顿脐橙	Washington navel SO	〃	LS28
48	化州橙	Huazhou SO	〃	LS4
49	摩洛哥酸橙	MOrocco sour orange	*C. aurantium* L.	LA18
50	朱 栾	Chuluan sour orange	〃	LA20
51	华农酸橙	Huanong sour orange	〃	0037**
52	巴甘檬	Bergamot	(*C. bergamia* Riss.)	LM59
53	枸头橙	Pi-tou cheng sour orange	*C. aurantium* L.	LA8
54	代代	Daidai sour orange	〃	LA14
55	光县酸橙	Guangxian sour orange	〃	0036**
56	真 橙	Tsengcheng yuzu	(*C. junos* Sieb.)	LA4
57	假酸橙	False sour orange	*C. aurantium* L.	LA5
58	江北香橙	Jiangbei yuzu	(*C. junos* Sieb.)	LP2
59	蟹 橙	Xiecheng yuzu	〃	LP4
60	旺苍香橙	Wangchang yuzu	〃	LP20
61	化 红	Huahong mandarin	*C. reticulata* Blanco	0090**
62	蕉 柑	Tankan tangor	(*C. tankan* Tan.)	LR22
63	广西沙柑	Guangxi nobilis mandarin	(*C. nobilis* Lour.)	LR156
64	黄岩本地广桔	Huangyanbendiguangju mandarin	〃	LR326
65	国庆4号温州蜜柑	Guoqin No.4 satsuma	(*C. unshiu* Marc.)	0091**
66	龟井温州蜜柑	Kamei satsuma	〃	0092**
67	尾张温州蜜柑	Owari satsuma	〃	0093**
68	米泽温州蜜柑	Yonezawa satsuma	〃	0094**
69	旺苍皱皮柑	Wangcangzhoupigan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR72
70	南丰蜜柑	Nanfeng mandarin	(*C. kinokuni* Tan.)	LR10
71	莳 桔	Shiju mandarin	〃	LR9
72	大红袍红桔	Dahongpao tangerin	(*C. tangerina* Tan.)	LR53
73	福 桔	Fuju tangerin	〃	LR34
74	汕头酸桔	Shantou sour mandarin	(*C. sunki* Tan.)	LR38
75	年 桔	Timkat mandarin	(*C. oleocarpa* Tan.)	LR93

续表 1

编 号 Code	中 文 名 Chinese name	英 文 名 Common name	学 名 * Scientific name	标本号** Voucher number
76	茶枝柑	Chatsukan mandarin	(*C. chachiensis* Tan.)	LR96
77	槾 桔	Mankieh mandarin	(*C. tardiferax* Tan.)	LR29
78	土 桔	Tuju mandarin	(*C. chuana* Tan.)	LR347
79	四会柑	Szu-ui-kon mandarin	(*C. suhuiensis* Tan.)	LR58
80	大香柑	Daxianggan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR43
81	大建柑	Dajiangan mandarin	〃	LR19
82	小建柑	Xiaojiangan mandarin	〃	LR20
83	大红柑	Dahonggan mandarin	(*C. erythrosa* Tan.)	LR95
84	马屎柑	Mashigan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR321
85	梅 柑	Meigan mandarin	〃	LR45
86	草市香柑	Caoshixianggan mandarin	〃	LR35
87	黄皮桔	Yellow-peel mandarin	〃	LR74
88	白 桔	Baiju mandarin	(*C. kinokuni* Tan.)	LR27
89	越南桔	Vietnam mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR329
90	纪洲蜜桔	Kishu mandarin	(*C. kinokuni* Tan.)	LR157
91	早 桔	Zhaoju mandarin	(*C. subcompressa* Tan.)	LR56
92	粗皮狗屎柑	Zhupigoushigan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR18
93	细皮狗屎柑	Xipigoushigan mandarin	〃	LR121
94	道县野桔	Daoxian wild mandarin	(*C. daoxianensis* He et Liu)	LR50
95	道县滑皮桔	Daoxianhuapiju mandarin	*C. reticulata* Blanco	0033**
96	迟 红	Cihongju mandarin	(*C. erythrosa* Tan.)	LR33
97	九月黄	Juyuehuang mandarin	〃	LR73
98	椪 柑	Ponkan mandarin	(*C. reticulata* Blanco)	LR318
99	瓯 柑	Ohkan mandarin	(*C. suavissima* Tan.)	LR82
100	黄果柑	Huangguogan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR67
101	克里迈丁红桔	Clementin	(*C. clementina* Tan.)	LR66
102	马鼻桔	Horse-nose mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR80
103	扁 桔	Bianju mandarin	〃	LR147
104	本地早桔	Bendizhaoju mandarin	(*C. succosa* Tan.)	0028**
105	朱红桔	Zhuhongju mandarin	(*C. erythrosa* Tan.)	LR32
106	脆皮柑	Chuipigan mandarin	*C. reticulata* Blanco	LR90
107	朱砂桔	Zhusaju mandarin	(*C. erythrosa* Tan.)	LR144
108	皱皮柑	Zhoupigan mandarin	(*C. vessucosa* Tan.)	LR134

注 (Note):

* 括号内为田中长三郎系统。

The taxon in the parenthesis is according to the Tanaka's system

** 试材采自华中农业大学柑桔园，标本为方德秋所制，存于华中农业大学柑桔研究室，数字为标本号。其余试材则采自中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔资源圃（重庆），代号为定植号，对应的标本存于该所资源室。

Collected from the Citrus Groves of Huazhong Agricultural University, and the number is the voucher. The others were collected from the National Citrus Collection Garden in Chongqin, the number with capital letters is the permanent planting number in this garden.

(二)方法

1. 酶液提取: 0.3g 成熟叶片或一年生枝皮层加 3ml 冷提取液(0.1mol /L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0, 内含 0.45mol/L 蔗糖, 0.006mol/L Vc, 0.006mol/L L-半胱氨酸、0.002mol/L EDTA-Na_2, 14m mol/L β-巯基乙醇), 匀浆, 在 0℃、14000rpm 下离心 15min, 上清液贮于 −20℃ 备用。

2. 电泳: 采用不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法。分离胶浓度 6—10%, 浓缩胶 2.5—3%, 凝胶缓冲液分别为 pH8.9 和 pH6.7 的 Tris-HCl。在 +4℃ 冰箱内电泳 4—5 小时。

3. 显色: 共分析了 8 种酶系统同工酶, 即过氧化物酶(POX)、谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)、6-磷酸葡萄糖变位酶(PGM)、6-磷酸葡萄糖异构酶(PGI)、苹果酸酶(ME)、超氧化物歧化酶(SOD)、四唑氧化酶(TO)及酯酶(EST)。POX 采用醋酸联苯胺法显色(吴少伯 1979), 其余 7 种酶的显色则参考 Torres 等(1978, 1982)和 Vajellos(1983)所述方法, 略加修改而成。

4. 资料整理及聚类分析: 先按酶种分别计算两样品间的酶谱相异系数(程家胜等 1986), 再取 8 个相异系数的平均值, 得出综合的相异系数值, 再将综合值输入 Super-XIII 型微型计算机进行距离系统类平均聚类分析(UPGMA)(徐克学 1982)。根据输出结果绘出聚类图(图 32)。

结 果 分 析

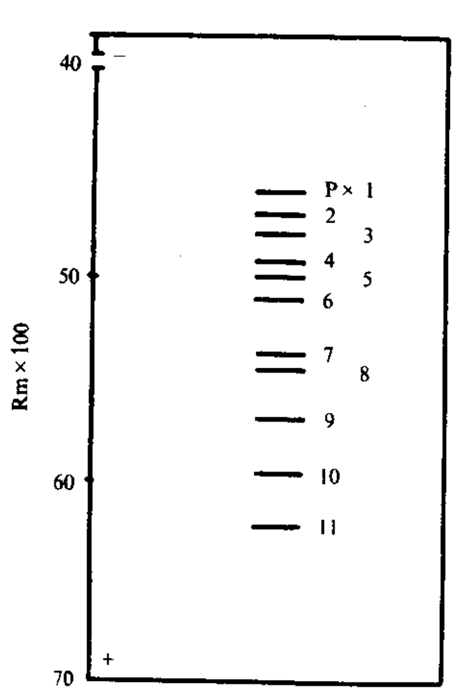


图 1 柑桔类植物POX同工酶中区酶谱模式
(电泳方向由 − → +, 下同)
Fig.1 Model zymograms of the middle region of POX isozymes of *Citrus* and its related genera(anode at the bottom)

(一) 柑桔类植物同工酶酶谱(图1—图 31)

1.POX 同工酶　柑桔类植物POX 同工酶酶带分布于慢(Rm<0.46)、中(0.46≤Rm≤0.62)、快(Rm>0.62)等三个区。在慢区, 种属间酶谱无差异; 快区酶带不稳定, 它会随环境条件不同而发生变化(肖顺元等, 1989); 中区酶带最为稳定, 种属间差异也最大; 因而本研究以中区酶带进行比较分析。在中区, 所有试材共出现 11 条酶带(图 1),其中在柑桔属中则出现了除 ρx2、ρx11 之外的 9 条带(图 2,3,4,5)。

2. GOT 同工酶　柑桔 GOT 同工酶酶带分布于 GOT−I、GOT−II 两个区(图 6)。其中 G1 带存在于所有试材中。在 GOT−I 区, 各试材表现为 1 或 3 条带。Torres 等(1978)认为此区是由 Got−I 基因位点控制,酶的结构为二聚体。本研究结果证实了他们的观点。在本研究中, 出现了一些 Torres 等所没有检测到的酶带。在红河橙中出现了只有 G4 带的带型, 四季抛中存在 G3 带, 而在金香柚中又表现为另外一种特殊的三带类型

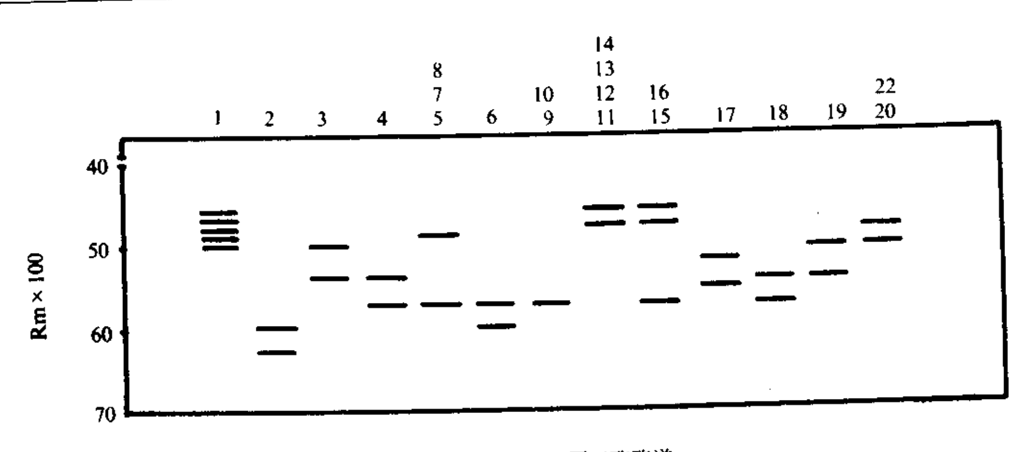


图 2 柑桔类植物POX同工酶酶谱

Fig. 2 POX isozymograms of *Citrus* and its related genera

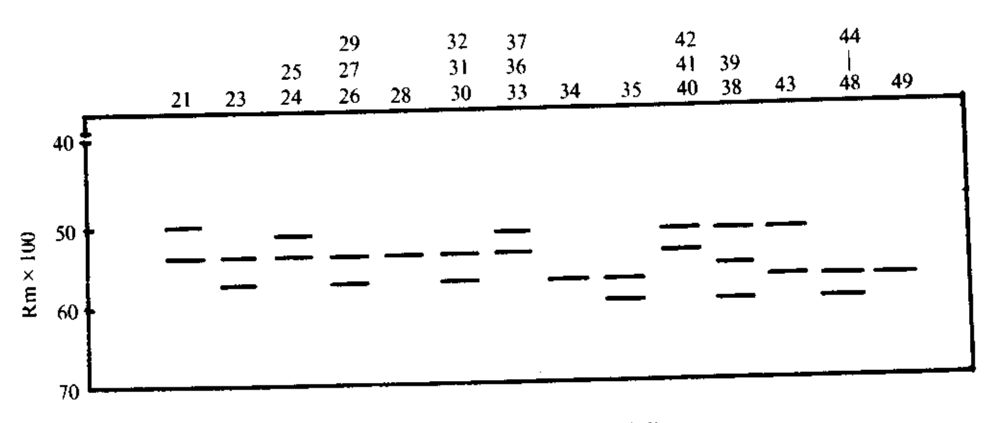


图 3 柑桔属植物POX同工酶酶谱

Fig. 3 POX isozymograms of *Citrus*

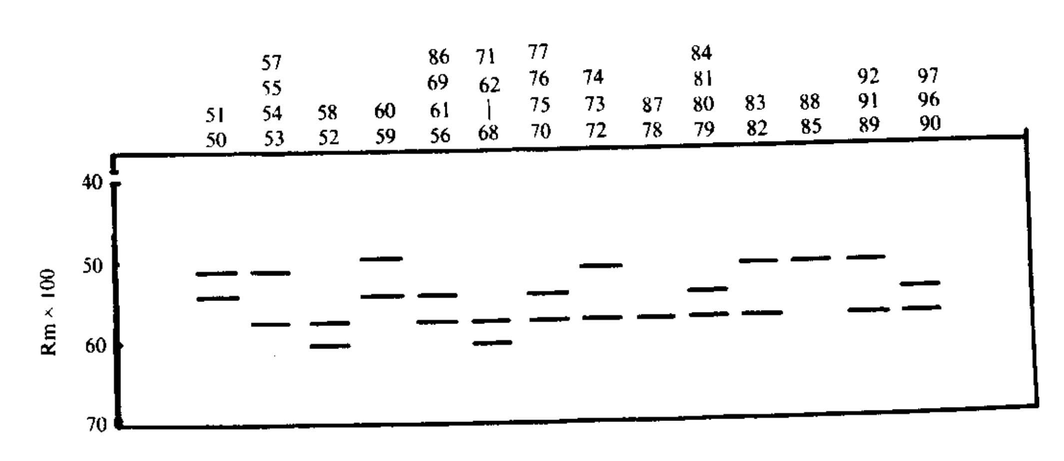


图 4 柑桔属植物POX同工酶酶谱

Fig. 4 POX isozymograms of *Citrus*

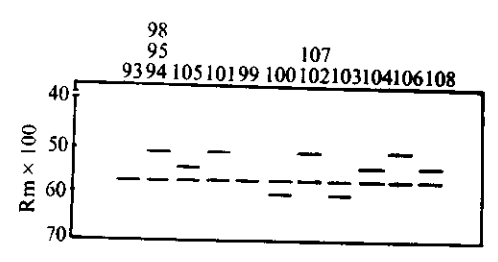


图5 柑桔属植物POX同工酶酶谱

Fig. 5 POX isozymograms of *Citrus*

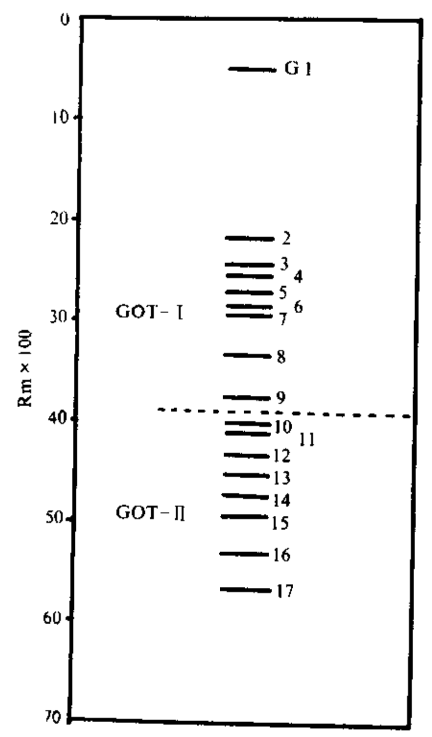


图6 柑桔类植物GOT同工酶酶谱模式

Fig. 6 Model GOT isozymograms of *Citrus* and its related genera

(图7, 8, 9)。

GOT-II区共出现8条带，各试材的酶带数为1—4条。酶带表现最为特殊的是在马鼻桔、细皮狗屎柑中所观察到的四带类型(图9)。在迄今笔者所见到的国内外研究论文中，尚未见到有关这种酶谱的报道。这表明中国原产柑桔类型具有独特的遗传组成，这也是中国作为柑桔属(尤其是宽皮柑桔)起源中心的一个明证。

3. TO同工酶 柑桔TO同工酶共出现7条带(图10)，其中Rm=0.61带存在于所有试材中(图11, 12)。在Rm<0.43区域，大多试材只有一条带，而在马蜂柑、小叶宜昌橙中出现了2条带，在构橼等试材中，则无带出现。在0.60>Rm≥0.43区，各试材的酶带数为1或2条。

4. PGM同工酶 所有试材共出现10条带(图13)。其中Rm=0.58、0.60两带仅在金柑类、构橼类、柠檬类、来檬类及富民枳中发现(图14,15)。该两带与柑桔的进化有着密切的关系。在Rm≤0.52区，共有8条带，试材间差异很大。在某一试材中，酶带数在1条(宽皮柑桔类、宜昌橙)至5条(酒饼勒)之间。

5. PGI同工酶 酶带分布于三个区(图18)，其中Pgi1带存在于所有试材中。中区(0.30<Rm<0.45)酶带最多，试材间差异较大。除四季抛、夔柑出现5条带外，其余试材皆为1或3条。快区(Rm≥0.50)酶带仅为1或2条，试材间差异不太大。

6. SOD同工酶 共检测到11条带(图22)。Sod 10仅出现在构橼类等少数试材中，它的存在与柑桔属的进化有关。Sod11带专一于澳洲指桔。属种间的差异主要反映在0.40≤Rm≤0.56区域的酶带上(图23, 24)。

7. ME同工酶 柑桔ME同工酶明显分布于两个区(图25)。慢区共有4条带，但在某一试材中，仅出现1或2条带(图26,27)。表现比较特殊的是金柑类、枳类及构橼类。快区只有2条带，试材间有所差异。

8. EST同工酶 在所有试材中，共检测到20条带，其中迁移极慢的3条带(Rm=0.15, 0.17, 0.19)为金柑属、枳属、柑桔属所共有，试材间无差异。从图谱(图29—31)可以看出，各试材间的差异较为明显，其中Rm=0.32、0.34、0.36三

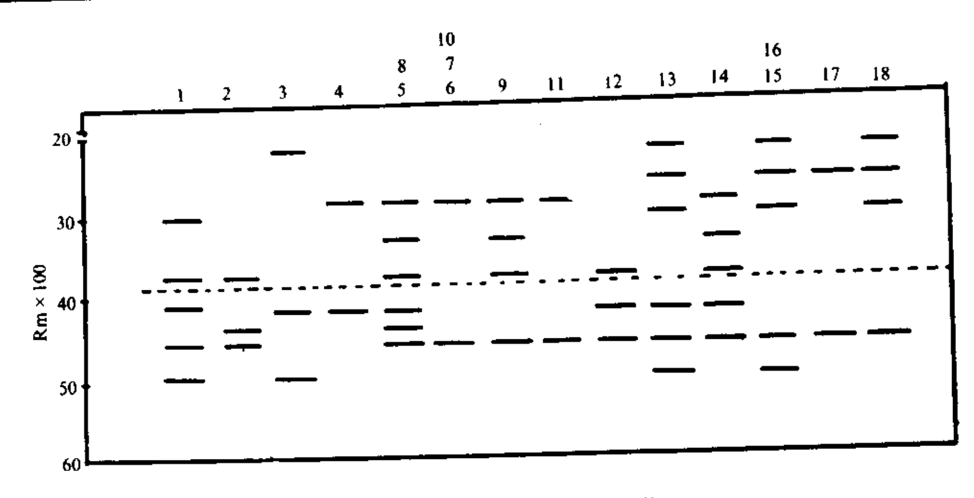


图 7　柑桔类植物GOT 同工酶酶谱

Fig. 7　GOT isozymograms of *Citrus* and its related genera

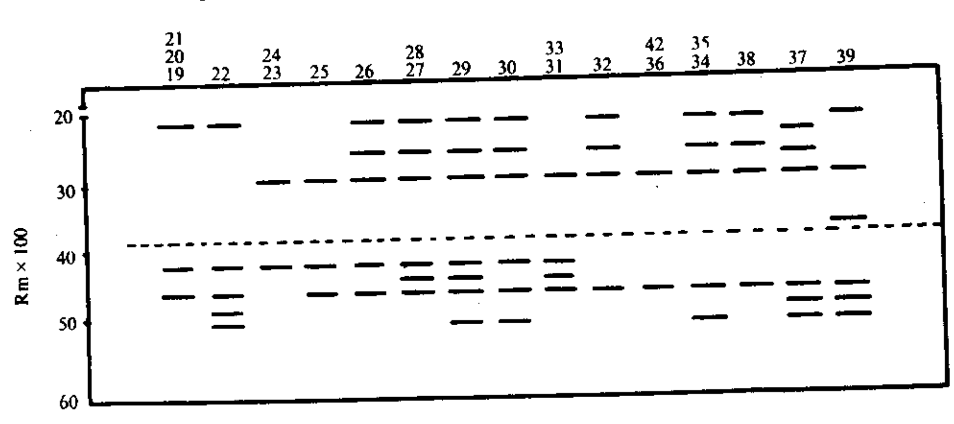


图8　柑桔属植物GOT 同工酶酶谱

Fig. 8 GOT isozymograms of *Citrus*

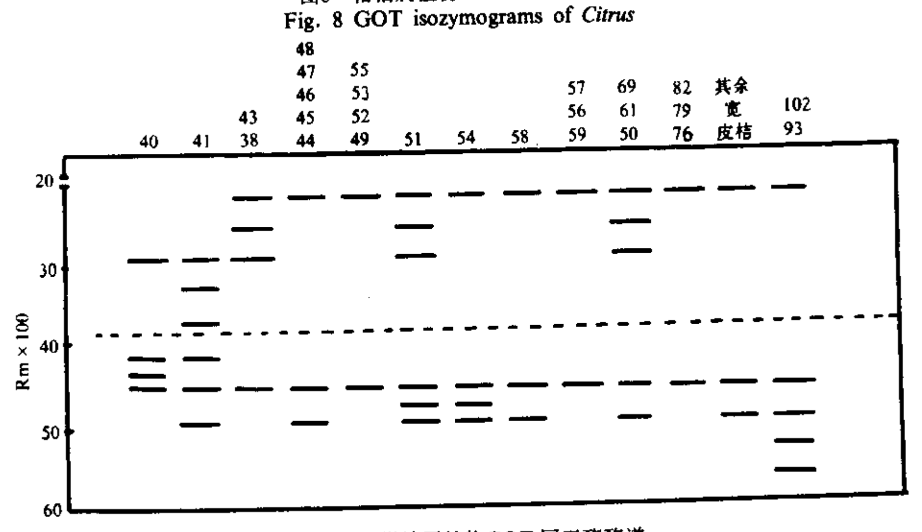


图9　柑桔属植物GOT 同工酶酶谱

Fig. 9　GOT isozymograms of *Citrus*

带仅出现于宽皮柑桔、甜橙、来檬、柠檬等试材中。

(二) 柑桔类植物不同生物型间的同工酶酶谱差异比较

1. 属间相异性比较

虽然只分析了九里香及澳洲指桔的4种同工酶系统，但从现有的图谱上也可看出6个属之间在酶谱上存在明显差异，各属基本上都具有自己独特的酶带。如从SOD及GOT同工酶上可见，Sod4为九里香和酒饼勒所特有，而Sod1、G12两带则专一于酒饼勒，但九里香具G10带。在澳洲指桔上，存在Sod11带。G6为金柑属和枳属所特有。Pgi8带又专一于枳。在ME同工酶上，可见金柑属独具Me3带，而Me4则专一于枳属。

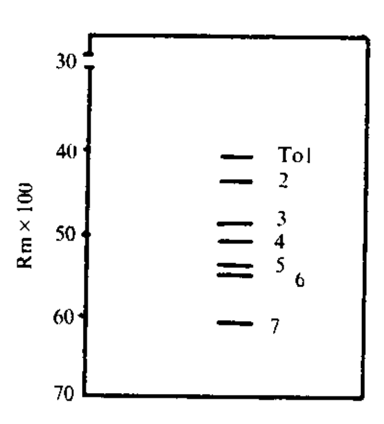


图10 柑桔类植物TO同工酶酶谱模式

Fig. 10 Model TO isozymograms of *Citrus* and its related genera

此外，从图谱上还可看出，九里香、酒饼勒、澳洲指桔三属的酶谱与其余三属差异较大。如在EST同工酶上，前三属不具Rm=0.15、0.17、0.19三带，而后三属则具之。在POX同工酶上，九里香属在慢区有5条带，而在柑桔属内，仅见部分宜昌橙具有一条带(图2)，而酒饼勒正反之，它的酶带迁移极快。

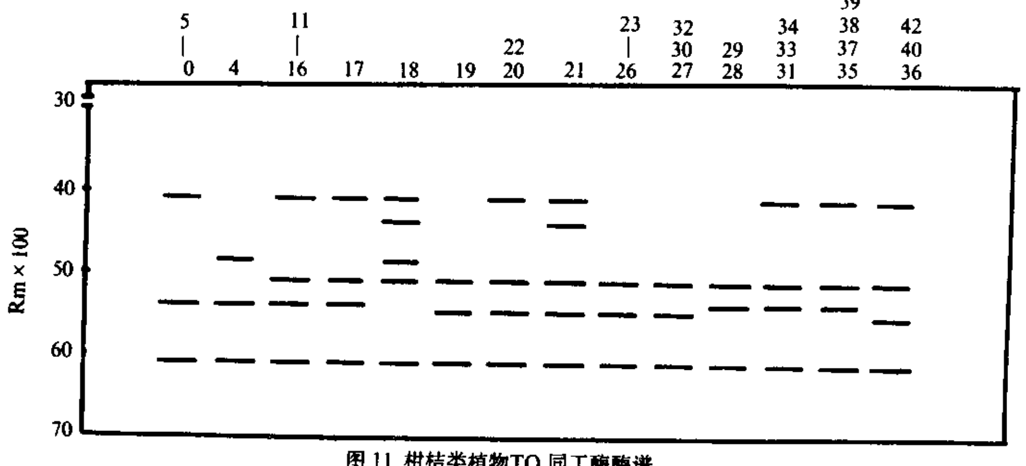


图11 柑桔类植物TO同工酶酶谱

Fig. 11 TO isozymograms of *Citrus* and its related genera

总之，属间同工酶酶谱差异较大。其中九里香、酒饼勒、澳洲指桔三属与其余三属的差异更大。

2. 属内相似性及相异性比较

(1) 枳属 在所分析的7个枳属试材中，除富民枳外，其余6个试材间表现出极大的相似性。其中飞龙枳与大叶小花枳的酶谱完全一致，矮化枳和小叶大花枳也仅在EST、POX同工酶上有所差异。

(2) 金柑属 在金柑属内。除长寿金柑外，其余4个种之间酶谱十分相似。

(3) 柑桔属 柑桔属内的酶谱变化十分复杂，各试材间酶谱差异较大。其中又以

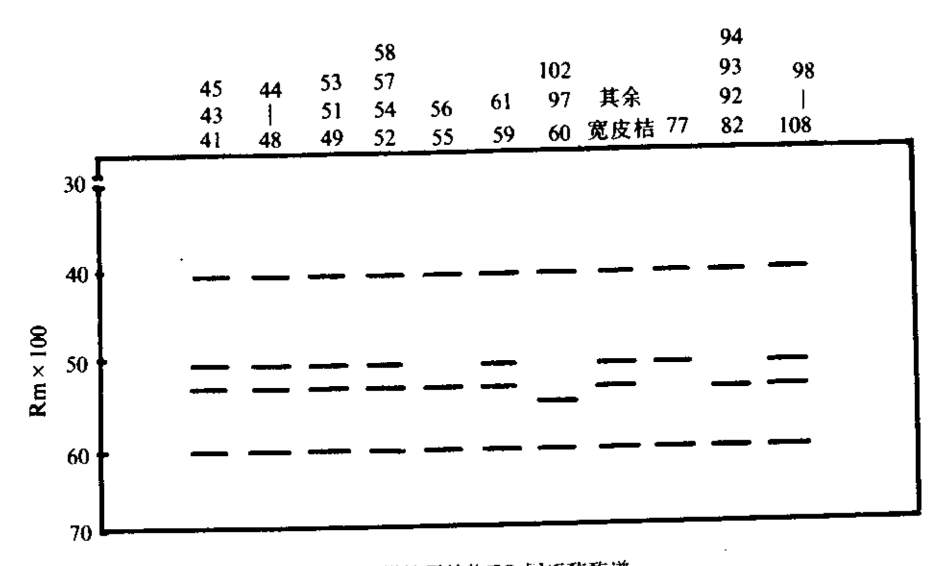


图12 柑桔属植物TO同工酶酶谱

Fig. 12 To isozymograms of *Citrus*

红河橙表现最为特殊，它独具Px8、G4两带；在酶谱上，也与其它试材明显不同。② 宜昌橙也表现为一个独特的类群。在此类群内，存在To2、To3、Px3、Px5、Sod7等稀有带。此外，在本类内，4个试材间的酶谱表现出一定的差异，这反映了宜昌橙内部遗传组成的复杂性。这种变异与宜昌橙的形态多样性是一致的。③ 在柑桔亚属内，试材间的同工酶酶带存在广泛的差异。但是，从另一方面看，各试材间酶谱又具有一定的相似性。这其中表现最为明显的是甜橙和温州蜜柑。本试验所分析的5个甜橙品种，在8种同工酶上，酶谱完全一致。这暗示所有甜橙品种可能来源于同一个祖先，而本种内品种的演化，则主要是经由无性变异途径而来。温州蜜柑所有品种的酶谱也完全一致。此外，大红袍红桔与福桔的酶谱也一样。此意味着二者可能是同物异名，抑或是来源于同一个祖先。

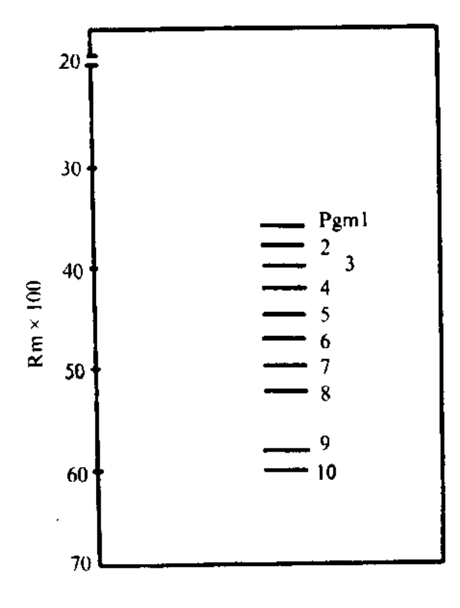


图13 柑桔类植物PGM同工酶酶谱模式

Fig. 13 Model PGM isozymograms of *Citrus* and its related genera

（三）枳属、金柑属、柑桔属试材同工酶谱带相异性类平均聚类分析

1. 属间相异性比较

图32是依据同工酶酶谱所作的柑桔三属相异性类平均聚类分析树系图。首先在平均相异系数为0.48处划线，可见枳属7个试材为一单独的类群，而金柑属和柑桔属则构成另一类群，两类群间的平均相异系数为0.49。次之，在0.44处划线，则可将金

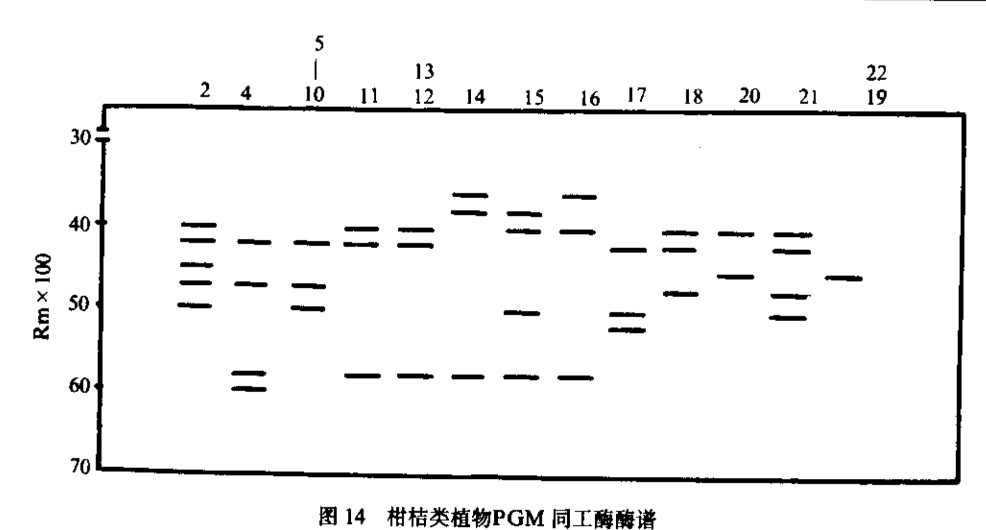


图 14 柑桔类植物PGM 同工酶酶谱
Fig. 14 PGM isozymograms of *Citrus* and its related genera

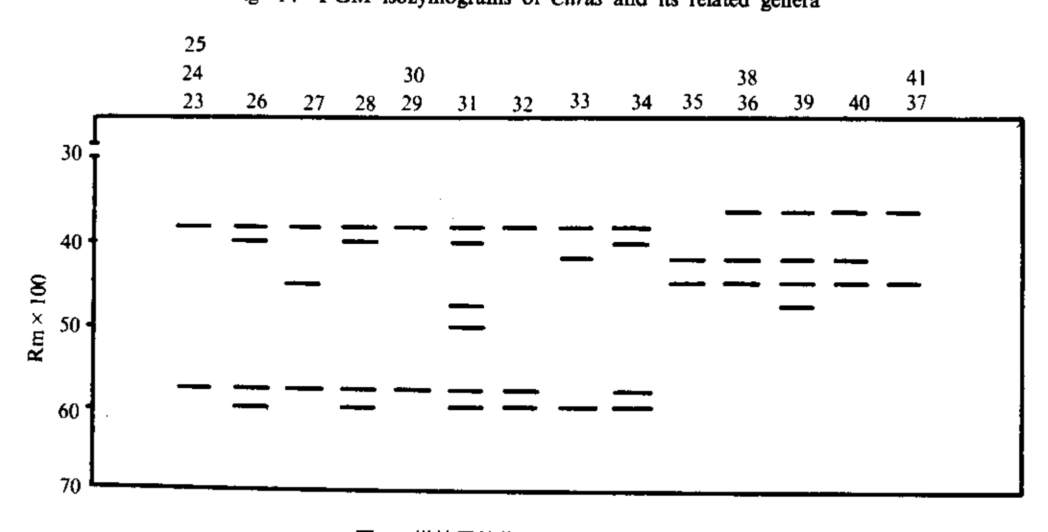


图 15 柑桔属植物PGM 同工酶酶谱
Fig. 15 PGM isozymograms of *Citrus*

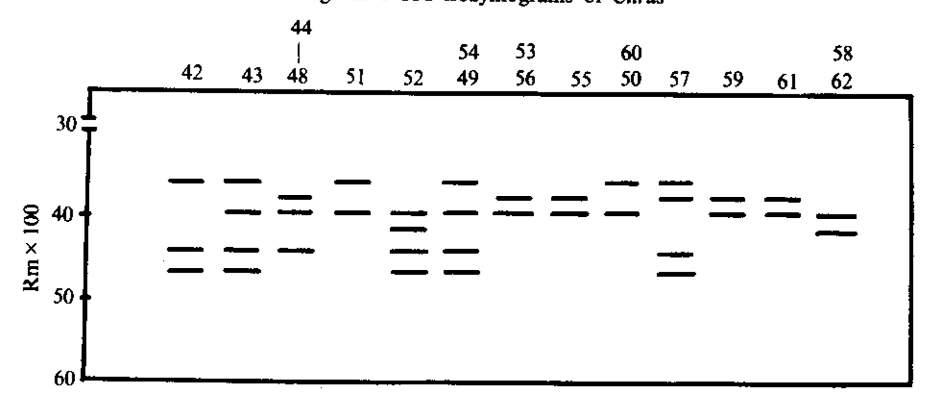


图 16 柑桔属植物PGM 同工酶酶谱
Fig. 16 PGM isozymograms of *Citrus*

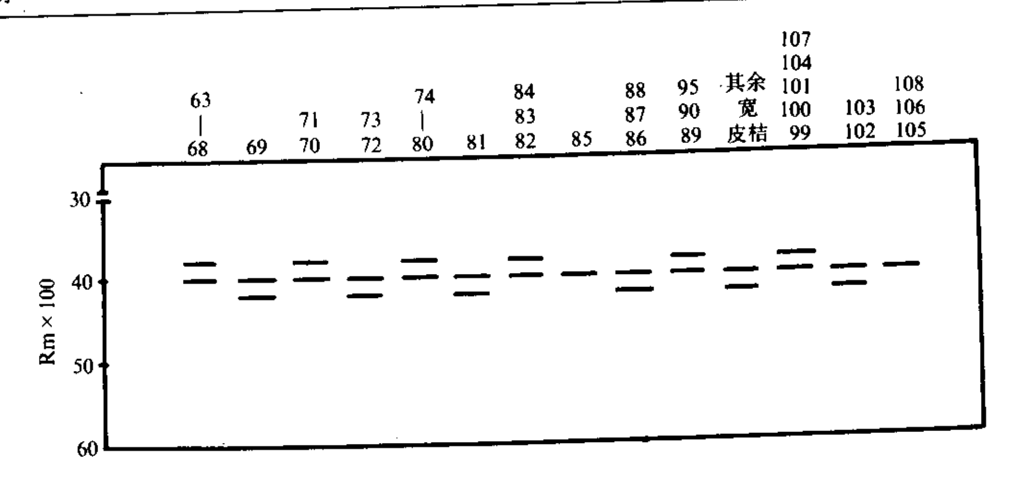


图 17　柑桔属植物PGM 同工酶酶谱

Fig. 17　PGM isozymograms of *Citrus*

柑属与柑桔属划开而成为两独立的类群。这表明，柑桔三属之间存在明显的差异，其中枳属与柑桔属的亲缘关系更远，这与其具有三出复叶等独特性状是相吻合的。

2. 属内相似性及相异性比较

(1)枳属　7 个试材全部聚于同一大类内。在此类内，除富民枳外，其余 6 个试材间的相异系数值较小，平均值为 0.175。这 6 个生物型又可分为两小类，即飞龙枳—— 大叶小花枳和大叶大花枳等小类。这表明，一方面，在 *P. trifoliata* Raf. 这个种内，不同生物型间在遗传组成上存在一定的差异，这和它们的形态差异是一致的，如飞龙枳就是被 Swingle (1967)当作枳的变种看待的；另一方面，不同生物型之间在遗传组成上又具有许多共同之处。

富民枳作为枳属的一个新类型，表现甚为特殊。在聚类图上，它明显远离其它枳类型，相异系数高达0.457。

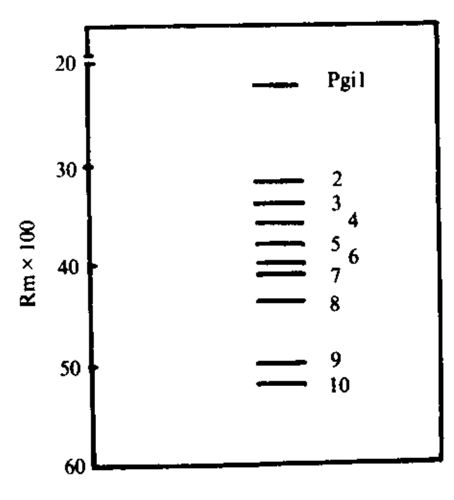


图 18 柑桔类植物PGI 同工酶酶谱模式

Fig. 18 Model PGI isozymograms of *Citrus* and its related genera

(2) 金柑属　试材包括 5 个种(Swingle系统的3 个种和 2 个杂种)。其中山金柑、罗纹、罗浮、遂川金弹聚合在一起，而长寿金柑与四季桔一块聚合在柑桔属的范围内。这表明长寿金柑是一个属间杂种。在聚于金柑属内的 4 个试材中，山金柑与罗纹的亲缘关系最近，相异系数仅为 0.130，接下来的是罗浮与金弹。

总之，金柑属内各种间(长寿金柑除外)的遗传组成比较相似，平均相异系数只有 0.210，低于枳属 (0.457)和柑桔属 (0.420)。

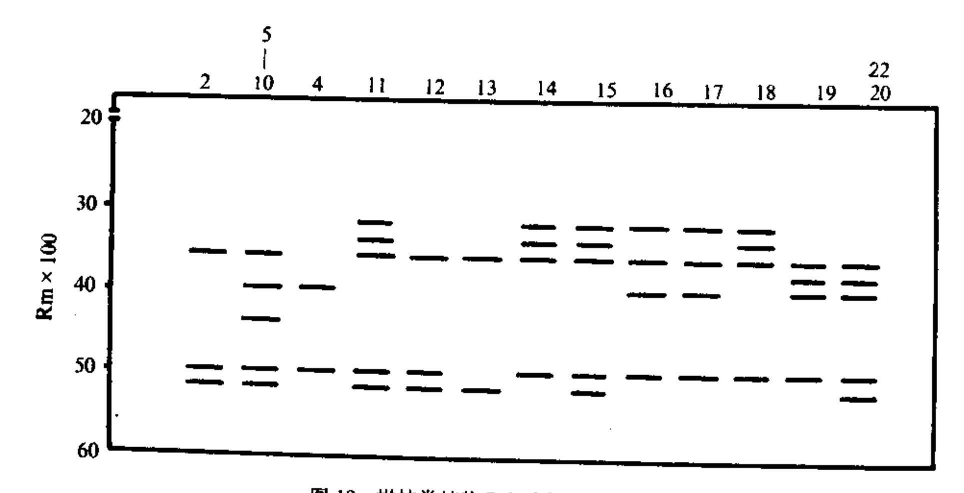


图 19. 柑桔类植物 PGI 同工酶酶谱
Fig. 19 PGI isozymograms of *Citrus* and its related genera

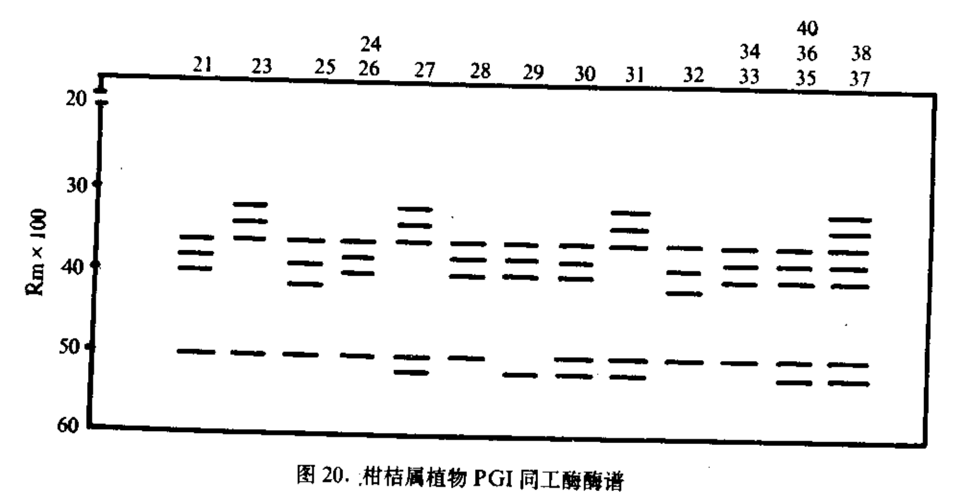


图 20. 柑桔属植物 PGI 同工酶酶谱
Fig. 20 PGI isozymograms of *Citrus*

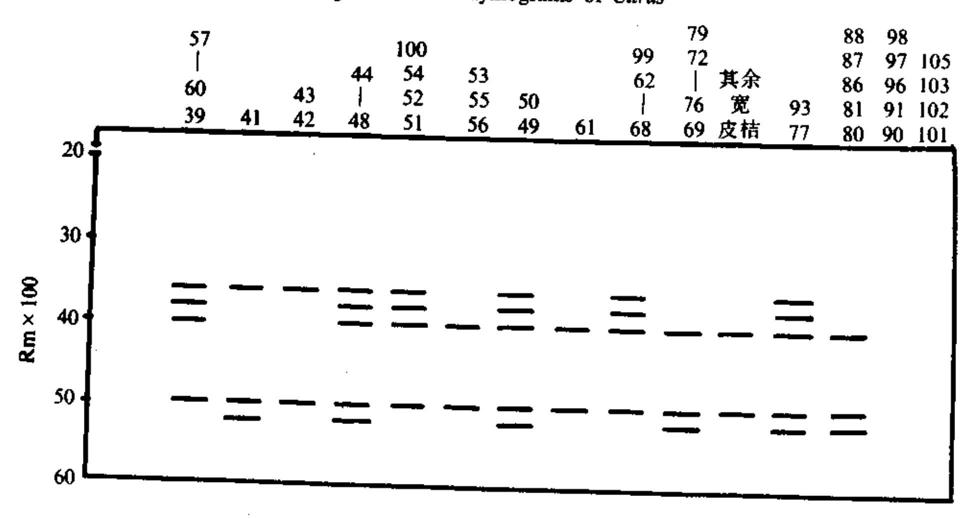


图 21. 柑桔属植物 PGI 同工酶酶谱
Fig. 21 PGI isozymograms of *Citrus*

3. 柑桔属内不同生物型间的相似性及相异性比较

柑桔属内的变异十分复杂，差异也很大。如果在相异系数为 0.300 处划线，则可将所测试材分成如下 7 类：

(1) 红河橙类　仅含红河橙一个试材，位于聚类图的右边。它与其它六类相距最远，相异系数达 0.420。红河橙是迄今在我国发现的最原始的柑桔属植物，聚类结果则证明了这一点。这表明中国不但是宽皮柑桔、宜昌橙的起源地，而且也是大翼橙类的起源中心之一。

(2) 马蜂柑类　只包含马蜂柑一个试材。

(3) 柚类　包括沙田柚、四季抛、梁平柚、垫江红心柚、马叙葡萄柚等。这表明葡萄柚带有柚的血缘。

(4) 宜昌橙类　4 个宜昌橙试材全部聚在此类内。

(5) 柠檬 - 来檬类　本类包括佛手、红檫檬、尤力克柠檬、北京柠檬、广西土柠檬、三个来檬试材以及粗柠檬。这意味着这些试材具有较紧密的亲缘关系。在形态上，它们都具有幼叶呈紫红色、翼叶不明显等性状。如果认为枸橼是基本种(Barrett 等 1976)，则檫檬、柠檬、来檬的起源皆与它有关。

(6) 枸橼类　仅含枸橼及其变种小香橼两个试材。

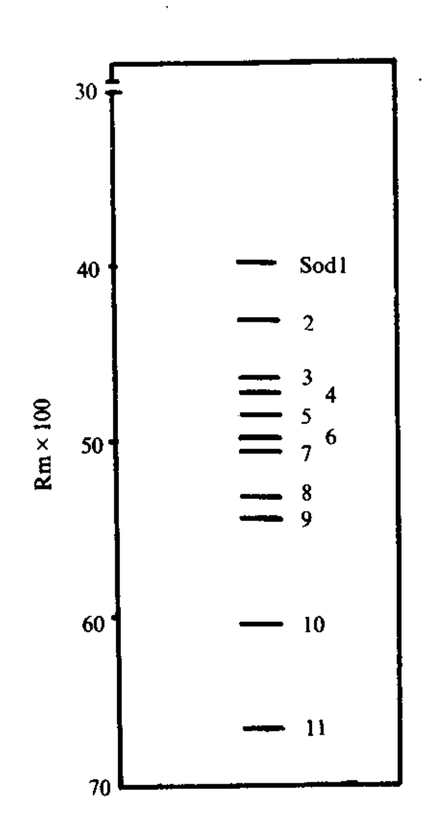
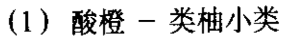


图 22 柑桔类植物SOD 同工酶酶谱模式

Fig. 22 Model SOD isozymograms of *Citrus* and its related genera

(7) 宽皮柑桔 － 橙类　包括所有的宽皮柑桔、甜橙、香橙试材，大部分酸橙和类柚生物型以及四季桔、长寿金柑等 2 个杂种。因为本类包含试材颇多，因而在 0.260 处划一线将该类划分为2 小类。



(1) 酸橙 － 类柚小类

包括摩洛哥酸橙、构头橙、代代等酸橙类型以及凤凰柚、金香柚、夔柑、三宝柑等类柚试材。由此可见，酸橙类与类柚类交叉聚合在一块，说明酸橙的起源与柚有关。另外，酸橙又与宽皮柑桔处于一大类内，则暗示它的起源又受到了宽皮柑桔的影响。

(2) 宽皮柑桔 － 甜橙小类

在此小类内，若除去长寿金柑、四季桔两试材，则其余试材之间的亲缘关系比较紧密，平均相异系数只有 0.210。

总之，依据聚类图。可以看出，柑桔三属间存在明显的差异，而属内的差异则以柑桔属最为明显，大翼橙类是柑桔属内的最原始类型，而甜橙及部分柑(如蕉柑)则为最进化类型。

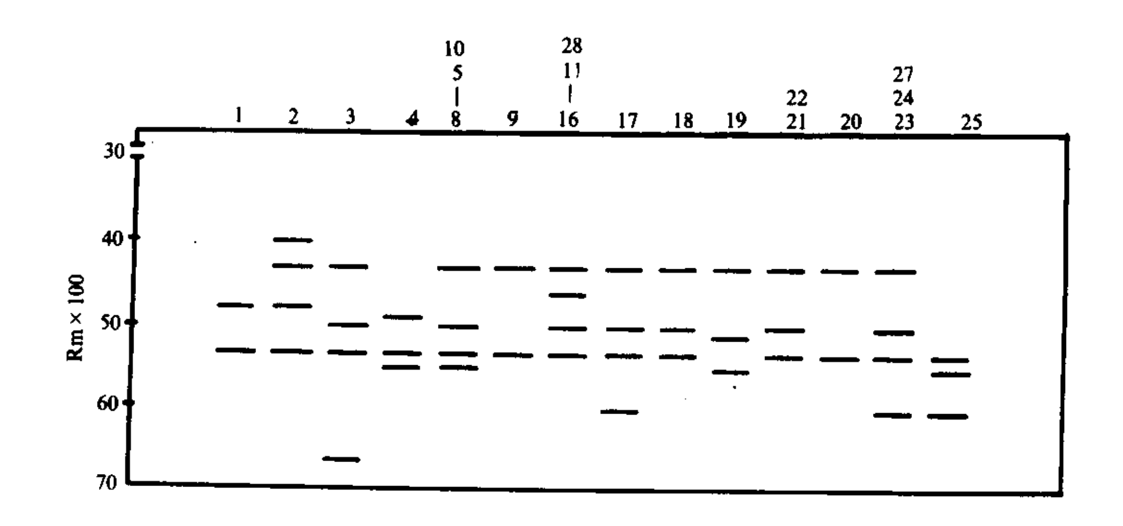


图 23 柑桔类植物 SOD 同工酶酶谱

Fig. 23 SOD isozymograms of *Citrus* and its related genera

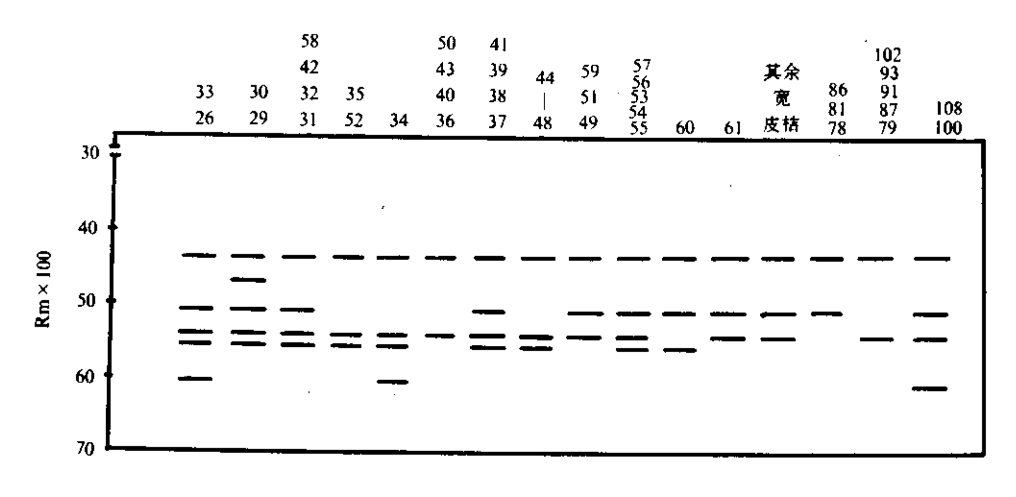


图 24 柑桔属植物 SOD 同工酶酶谱

Fig. 24 SOD isozymograms of *Citrus*

讨 论

1. 富民枳的分类地位及其在进化中的作用

富民枳是丁素琴等(1984)1977年在云南富民县发现的一个常绿枳类型，形态上与普通枳差异较大，丁氏把它定为一新种—— *Poncirus polyandra* S. Q. Ding。 本试验比较了富民枳与普通枳在8种同工酶系统上的差异，发现在所有的同工酶酶谱上，两者皆存在明显的差异。富民枳具有若干条普通枳所不具的酶带。 在聚类图上，富民枳

虽聚在枳属内，但它与其它 6 个枳生物型的平均相异系数竟高达 0.457。这些结果表明：富民枳是枳属一新类型，并能以种的地位存在。

Swingle (1967) 认为枳属以一个孤立状态存在于柑桔类果树群内，它以其冬季落叶、三出复叶等独特性状与本群内的其余 5 个属隔离开来，但它又与柑桔属有着千丝万缕的联系，说明枳属与柑桔属之间存在一些失去的"环节"。在云南发现富民枳，部分地证实了 Swingle 的推测。富民枳可能就是这些"环节"中的一个，它是联结枳属与柑桔属的桥梁。

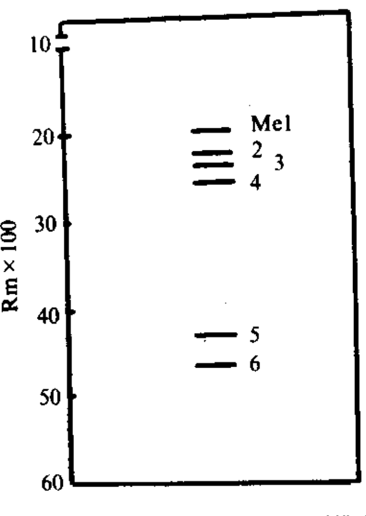


图 25　柑桔类植物 ME 同工酶酶谱模式
Fig. 25 Model ME isozymograms of *Citrus* and its related genera

2. 宜昌橙的分类地位

学术界对于宜昌橙的分类地位是有争议的，Swingle (1967) 将其归于大翼橙亚属，而田中长三郎则归于后生柑桔亚属(Tanaka 1977)。近年来的一些研究结果多认为宜昌橙属为较厚始的类型，归于后生柑桔亚属是不太妥当的(叶荫民等1982; 朱立武 1988)。但是，宜昌橙的雄蕊联合成束，单花、抗寒性极强等性状又使它与其它起源于热带及亚热带地区的大翼橙类有所不同，组分 I 蛋白的分析结果也证明了这一点

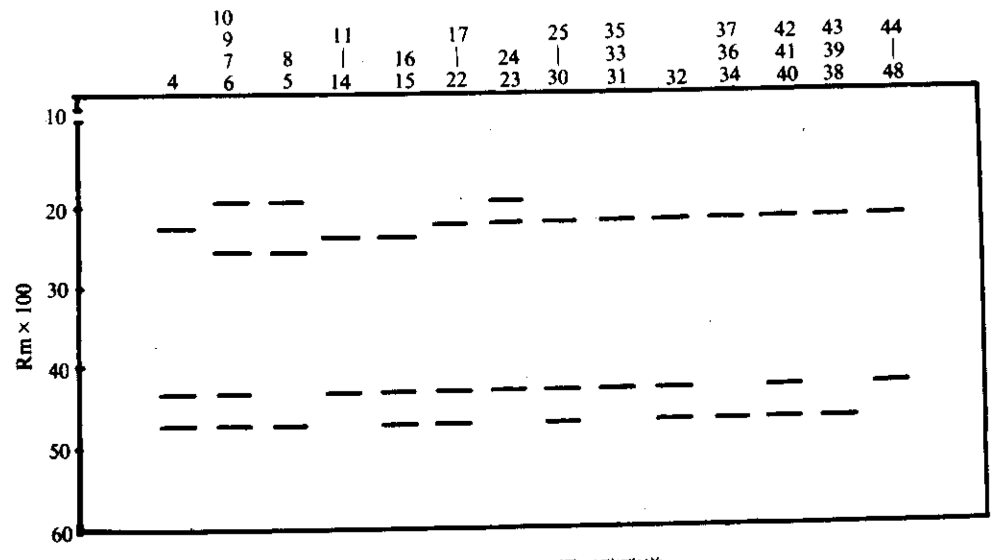


图 26　柑桔类 植物 ME 同工酶酶谱
Fig. 26 ME isozymograms of *Citrus* and its related genera

(Handa & Oogaki 1986)。从本研究结果可看出，宜昌橙具有多条特有的酶带，在聚类图上则成为一独立的类群，与红河橙及马蜂柑相距较远。因此，把各方面的研究结果综合考虑，我们认为宜昌橙可能是作为一个独立的类群存在于柑桔属内，它既不同于大翼橙亚属植物，又与柑桔亚属植物有所差异，因而它与这两个亚属的关系是平行的，即宜昌橙应以亚属的地位存在于柑桔属中。

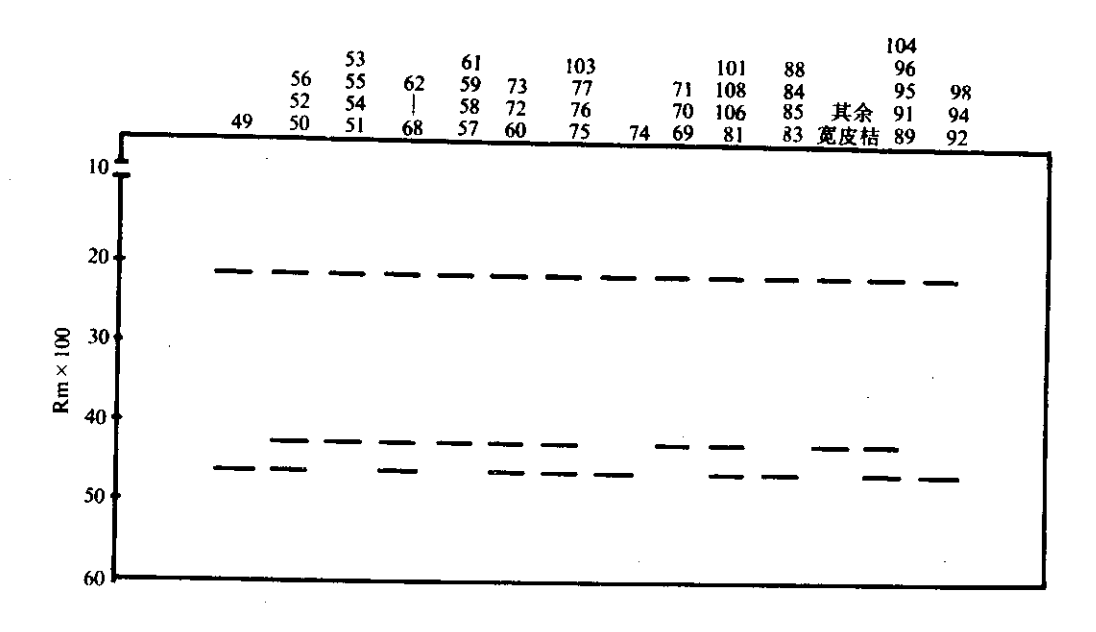


图 27　柑桔属植物 ME 同工酶酶谱

Fig. 27　ME isozymograms of *Citrus*

3. 小果宽皮柑桔类型在进化中的作用

Swingle 在进行宽皮柑桔的分类时，就注意到了小果类型的重要性，例如他不承认许多栽培类型，如温州蜜柑具有种的地位，而却给予立花桔 *C. tachibana* Tan. 和印度野桔 *C. indica* Swingle 以种的地位(Swingle 1967)。这两个种皆是果小、味酸类型。据本研究分析，迄今仍处于野生状态的道县野桔，粗皮狗屎柑、马鼻桔、细皮狗屎柑等 4 个试材与其余宽皮柑桔有着一定的区别，且它们皆是果小、味酸类型。其中马鼻桔、细皮狗屎柑在 GOT 同工酶上表现甚为特殊，它具 G16、G17 两带，这说明中国宽皮柑桔具有独特的遗传组成，这两个试材也许是中国起源最为古老的宽皮柑桔类型。控制它们所特有的 G16、G17 两带的基因可能来源于柑桔亚科的其它植物。无疑，弄清这两带的来源，对于了解宽皮柑桔的起源也许具有较重要的意义。

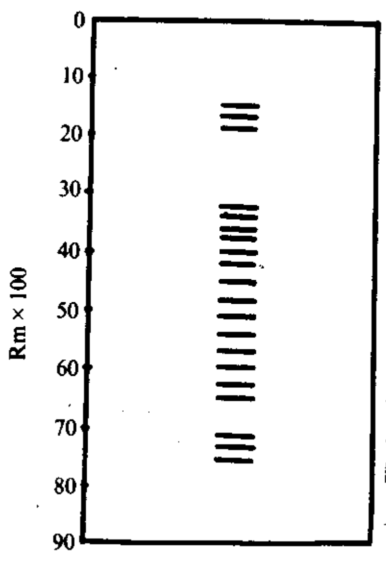


图 28 柑桔类植物 EST 同工酶酶谱模式

Fig. 28 Model EST isozymograms of *Citrus* and its related genera

总之，小果宽皮柑桔是较为原始的类型，在柑桔进化中起着较为重要的作用，它们是进一步演化成其它宽皮柑桔类型的泉源。中国原产宽皮柑桔的代表以马鼻桔或细皮狗屎柑为佳。

4. “柑”的起源

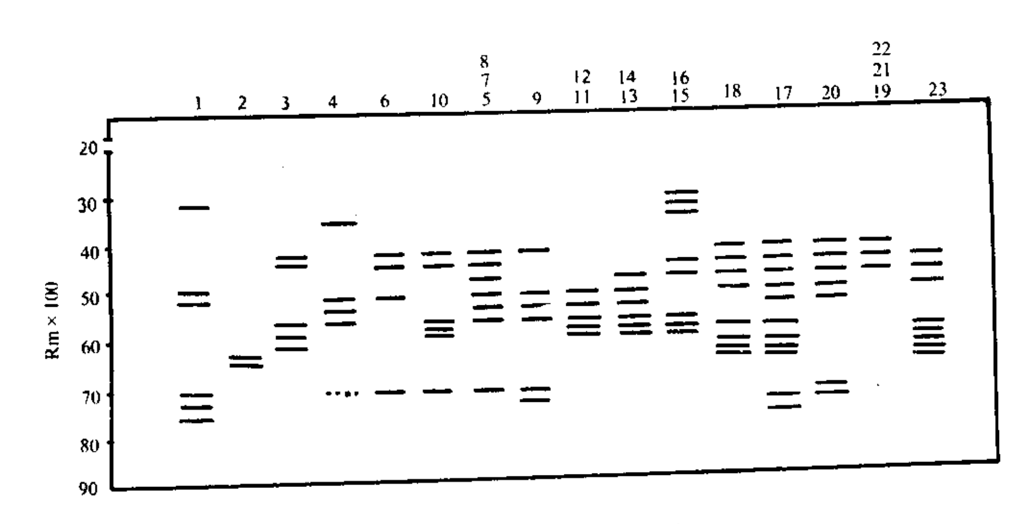


图 29　柑桔类植物 EST 同工酶酶谱

Fig. 29 EST isozymograms of *Citrus* and its related genera

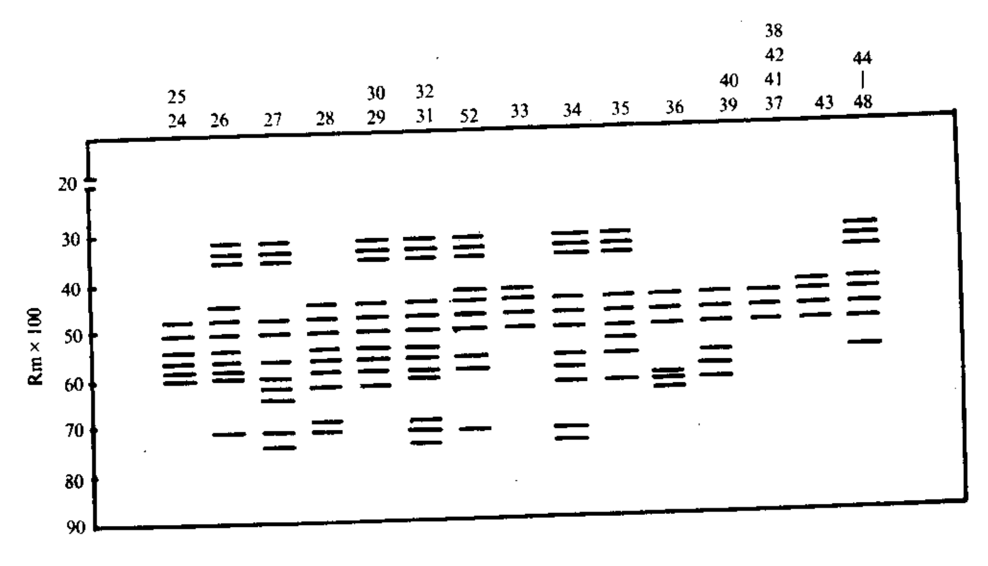


图 30　柑桔属植物 EST 同工酶酶谱

Fig. 30 EST isozymograms of *Citrus*

由于柑的形态介于桔与甜橙之间，因而一些西方学者认为柑乃是桔橙杂种(Barrett and Rhodes 1976)。国内一些研究者则根据我国古书中"桔"字出现在前，"柑"字出现在后的记载，也支持这个观点(肖尊安 1986)。但是否所有的"柑"都是桔橙杂种呢？这是值得怀疑的。无疑，有一些柑是属于桔橙杂种，如蕉柑，它在聚类图上与甜橙聚合在一块，酶谱也表现为甜橙与椪柑的杂合型。但是典型属于柑类的瓯柑、皱皮柑在聚类图上，与桔类交叉在一起，而与甜橙相距较远。此外，甜橙所具有而在桔类中未发现的 Pgm6 带，在柑类试材中也未检测到。另外，从古书的记载上看，"橘"字在秦代

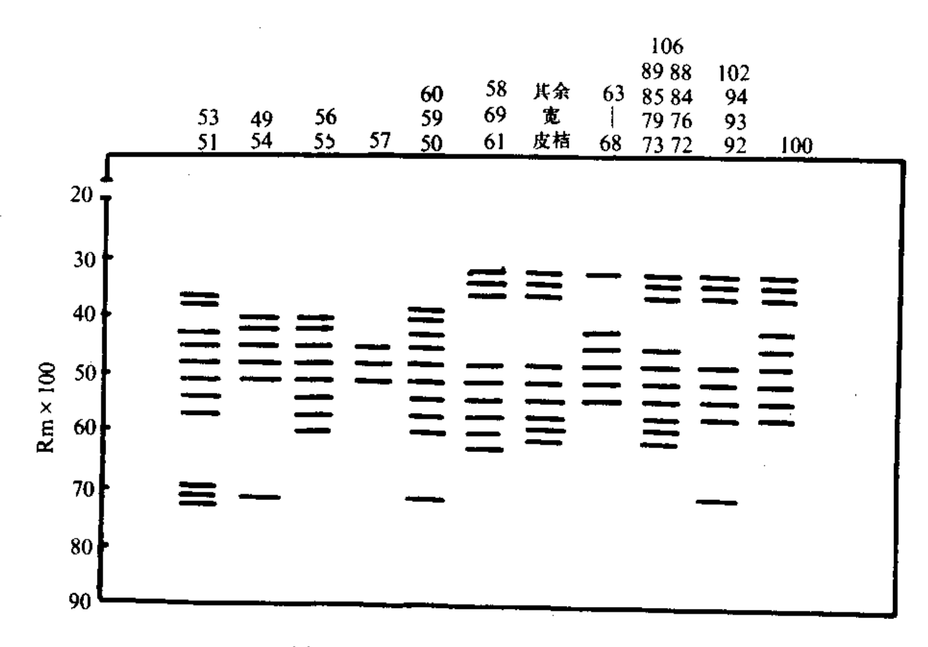


图 31 柑桔属植物EST 同工酶酶谱
Fig. 31 EST isozymograms of *Citrus*

以前就已出现，"柑"字在汉代出现，而"甜橙"的出现则甚为迟晚(约于 18 世纪)。若考虑古人不是称"甜橙"，而是称"黄甘"，则最早的记载也只能溯源于汉代。基于这点出发，似很难认为"柑"乃桔橙杂种。次者，瓯柑是源于温州、黄岩等地的古老品种，宋代韩彦直在《橘录》中称之为"真柑"或"乳柑"(韩彦直 1176)。但在同一本书中，并未见到有关甜橙的记载，说明当时温州、黄岩尚无甜橙栽培。再次者，近年来湖南农学院陈梦龙等在湖南宜章县的莽山发现了成片的莽山野柑林，但在当地的柑桔资源中，除莽山野桔外，并未发现甜橙类资源，因而很难认为莽山野柑是野桔与甜橙的杂种。

综上所述，是否所有的"柑"都是来源于桔与甜橙的杂种，很值得进一步研究。笔者认为，一部分柑可能来源于桔橙杂种，如蕉柑；而另一些柑则可能是仅由桔演化而来，如瓯柑。

5. 对部分生物型的起源探讨

(1) 长寿金柑

Swingle(1967) 认为长寿金柑是金柑属的种间杂种，而田中长三郎则认为是一个种 —— *F. obovata* Tan.，(Tanaka 1977)。本研究结果表明它不是一个真正生物种，也不是金柑属内的种间杂种。而是金柑属与柑桔属的属间杂种。

(2) 温州蜜柑

有关温州蜜柑的祖先，田中长三郎认为是黄岩的早桔、槾桔或本地早桔中的一种(高桥郁郎 1958)。但这三种柑桔与温州蜜柑在形态上差异甚殊，因而田中氏的推测是很难成立的。

本研究结果表明，4 个温州蜜柑品系的同工酶酶谱与黄岩本地广桔的完全一致，平

均相异系数为 0。 这意味着两者具有极为密切的亲缘关系。 另外，在树性及花果形态等方面，温州蜜柑与黄岩本地广桔具有许多相似之处，所具的差别则是黄岩本地广桔种子多、果面粗糙、皮厚，味不良。 但是，日本最古老的“在来系”温州蜜柑也同样具有这些不良性状。 因此，我们认为温州蜜柑系来源于黄岩本地广桔的实生变异。

(3) 香橙

香橙广泛分布于长江流域各省，在我国具有悠久的栽培历史，在先秦的作品中就已提及，当时被称为“櫾系”(叶静渊 1958)。学术上，有关香橙的分类地位是有争论的(Swingle 1967; Tanaka 1977; 俞德浚 1979)。 在本试验中，发现蟹橙、旺苍香橙具有宜昌橙特有的 Px5 带，说明香橙具有宜昌橙的血缘。 在聚类图上，香橙类聚于宽皮柑桔大类内，与宽皮柑桔的平均相异系数为 0.205，这又表明香橙与宽皮柑桔具有较密切的亲缘关系。 总之，同工酶研究结果支持 Swingle(1967)认为香橙乃宜昌橙与宽皮柑桔的杂种的观点。

江北香橙虽被冠以香橙的名字，但在形态上，它更接近宽皮柑桔。 在聚类图上，则远离香橙类，而与甜橙、温州蜜柑聚在一起。 因而作者推测，江北香橙属于宽皮柑桔的类型，或它是香橙进一步与宽皮柑桔的回交后代。

(4) 酸橙

在古罗马及古希腊书籍中，酸橙是仅晚于枸橼而出现的第二个柑桔类植物，也是林奈所订柑桔属内两个种中的一个(Swingle 1967)。 有关它的分类地位，学术界争论颇少。 但到了本世纪七十年代，Barrett 等(1976)则认为酸橙乃柚与宽皮柑桔的杂种。从本研究结果可看出，酸橙与宽皮柑桔聚合在同一大类内，说明它受到宽皮柑桔的影响；另外，它与类柚交叉聚合同在二小类内，又表明它带有浓重的柚的血缘。 另外，华农酸橙则处在柚类内，这更说明了柚对于酸橙的影响作用。 总之，本试验结果支持 Barrett 等人的观点。

(5) 红檬檬

红檬檬是原产我国华南的热带柑桔植物。 Swingle(1967)认为它是柠檬与宽皮柑桔的杂种，而田中长三郎则给予它以种的地位—— *C. limonia* Osbeck(Tanaka 1977)。本研究分析表明，从酶谱上看，红檬檬是一个杂种，宽皮柑桔可能是其亲本之一。 柠檬、枸橼则可能是另一个亲本。 但是，柠檬非中国原产，据田中长三郎考证，中国在宋代前尚未引入，就是近代也栽培甚少。 而红檬檬在中国具有悠久的栽培历史，在北宋苏东坡的词中就有关于它的记载，当时称“黎檬子”(叶静渊 1958)。 可见从时间上看，柠檬不太可能作为红檬檬的亲本。 而枸橼则不同，枸橼及其变种小香橼、佛手广泛分布于中国华南及西南各地，东汉前就有人工栽培。 此外，最近的调查表明，在贵州罗甸、广西沙池、宜山一带发现了野生状态的红檬檬和白檬檬。 根据上述研究结果，我们认为红檬檬可能是枸橼与宽皮柑桔的杂种。

6. 柑桔类植物的系统发育

柑桔类植物的演化是多途径的，而且互相交错。 我们根据本研究结果，并综合他人的工作，初步绘出了柑桔三属植物的演化图(图 33)。 下面是对于演化图的几点说明：

(1) 柑桔属共有 5 个“基因源”，即大翼橙类、宜昌橙类、枸橼类、柚类及桔类。 源

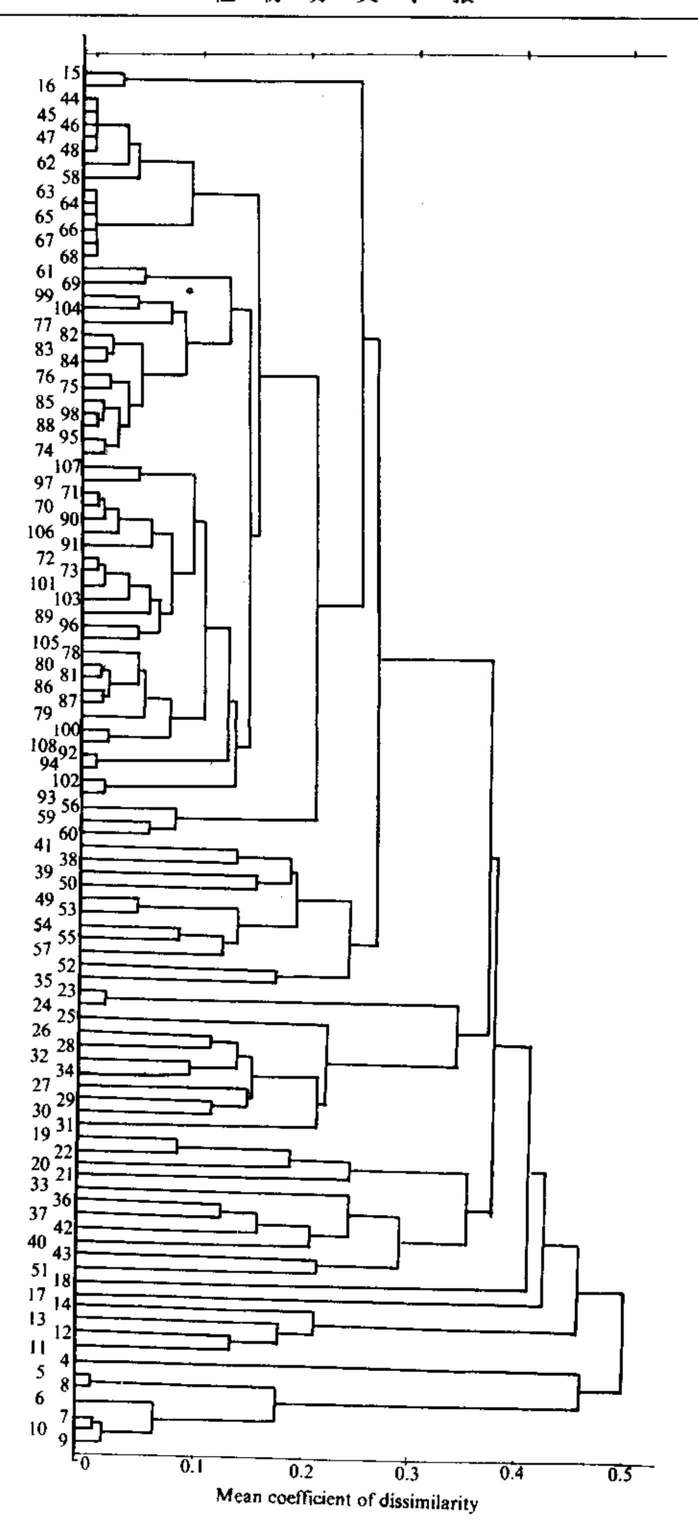


图 32 柑桔属、金柑属和枳属植物同工酶谱带相异性类平均聚类分析树系图

Fig. 32 The phylogenetic tree of cluster analysis constructed by the dissimilarities of the isozyme patterns in *Poncirus*, *Fortunella* and *Citrus*

内的类型属于原始柑桔类型，它们是进一步演化成其它柑桔类型的要素。

（2）在源与源之间的进行杂交的同时，各源内部也在进行不同程度的演化，从而使各源的容量不断地变化。

（3）在柑桔属内，大翼橙类是最原始的类型，而部分柑类，甜橙及葡萄柚则是较进化类型。

（4）后生柑桔类型的起源主要是由于源与源之间的杂交以及原生柑桔类型的有性或无性变异。

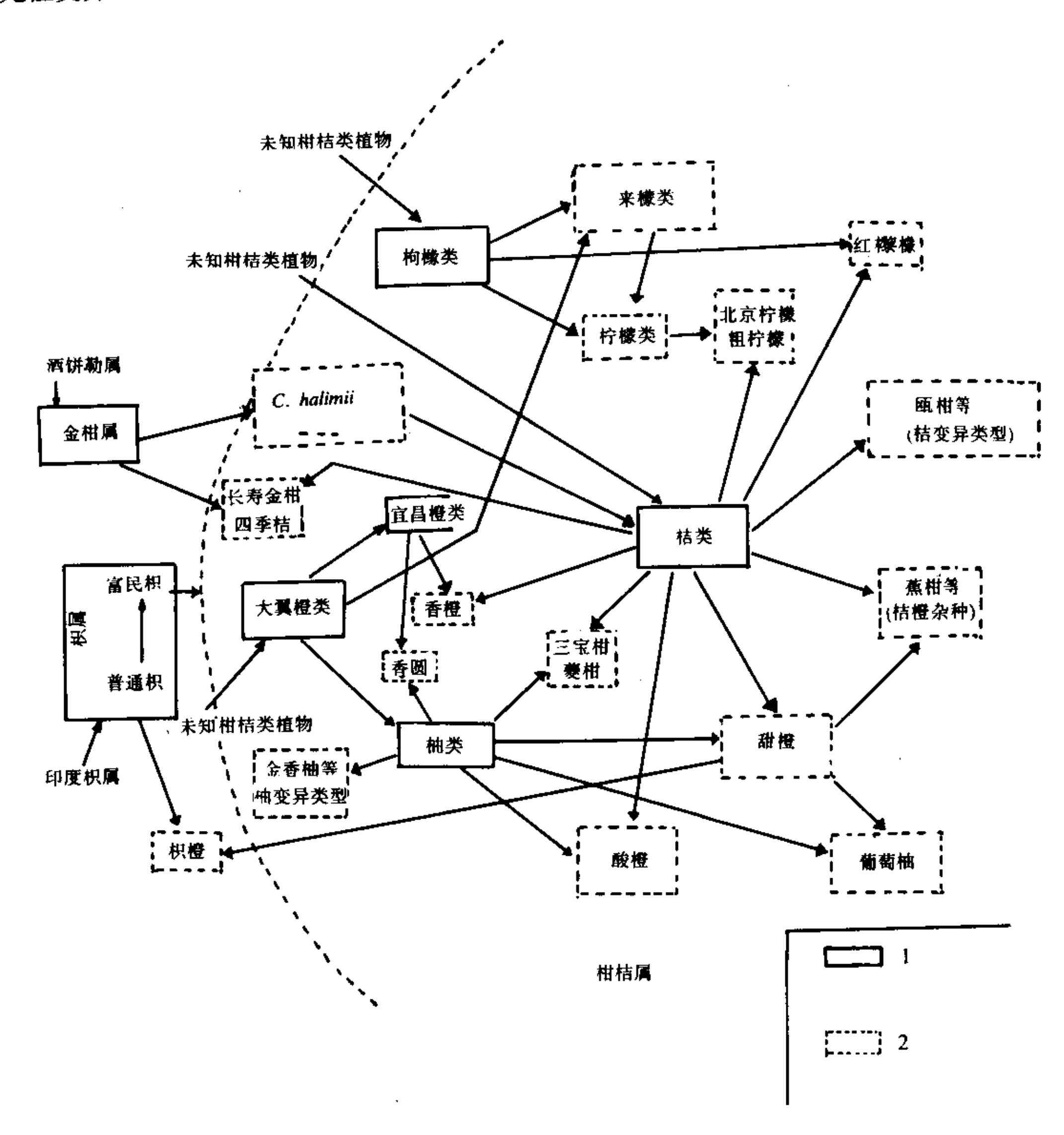


图 33　柑桔属、金桔属和枳属植物演化图

1. 原生类型(柑桔属的基因源)；2. 杂种或后生类型。

Fig. 33　Phylogenetic diagram of *Poncirus*, *Fortunella* and *Citrus*

1. primitive types; 2. epigenotypes or hybrids.

（5） 由于后生柑桔类型之间的杂交以及后生原生类型与原生类型之间的进一步杂交，或与它属植物的杂交，使得柑桔属植物进一步演化，从而形成目前这种类型繁多、变异广泛的境况。

参 考 文 献

[1] 丁素琴、张显努、暴卓然、梁明清，1984: 中国枳属一新种。 云南植物研究，6(3): 292— 293。

[2] 叶荫民、孔焱、郑何红，1982: 柑桔花粉形态的研究。 中国农业科学，(5): 62— 66。

[3] 叶静渊，1958: 中国农学遗产选集"柑桔"(上篇)， 中华书局出版，北京。 97— 140。

[4] 朱立武，1988: 中国柑桔数量化学分类研究。 植物分类学报，26(5): 353— 361。

[5] 吴少伯，1979: 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳。 植物生理学通讯，(1): 30— 33。

[6] 肖顺元、章文才，1989: 谷草转氨酶、过氧化物酶同工酶在柑桔遗传育种中应用的比较研究。 中国柑桔，18(2): 9— 12。

[7] 肖尊安，1986: 柑桔叶片过氧化物酶同工酶的遗传研究。 西南农业大学学报，(1): 124— 128。

[8] 陈力耕、大村三男、日高哲志，1991: 应用 GOT 同工酶进行柑桔分类的研究。 园艺学报，18(1): 27— 32。

[9] 俞德俊，1979: 中国果树分类学。 农业出版社，北京。 279— 304。

[10] 徐克学，1982: 浅淡分类学的数学方法。 植物分类学报，20(4): 502— 508。

[11] 梁国鲁，1990: 柑桔类的细胞分类学研究，I. 柑桔属 30 个分类群的核型及进化。 武汉植物学研究，8(1): 1— 7。

[12] 程家胜、刘捍中、韩礼星、郧淑艳，1986: 关于苹果属果树亲缘关系的初步探讨—— 过氧化物酶同工酶分析。 园艺学报，13(1): 1— 8。

[13] 韩彦直，1178:《橘录》。

[14] 曾勉，1960: 对柑桔分类的认识体会和整理意见。 中园果树，(2): 31— 37。

[15] 高桥郁郎，1858: 柑橘，第四版。 东京 堂，东京。 12。(日文)。

[16] Barrett, H. C. & Rhodes, A. M. 1976: A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated citrus and its close relatives. *System. Bot.* **1**(2): 105— 136.

[17] Handa, T. & Oogaki, C. 1985: Numerical taxonomic study of Citrus L. and Portunella Swingle using morphological characters. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* **54**: 145— 154.

[18] Handa, T. & Oogaki, c. 1986: Phylogenetic study of fraction I protein in the genus Citrus and its close related genera. *Jpn. J. Genet.* **61**(1): 15— 24.

[19] Hirai, M. & Kijiura, I. 1987: Genetic analysis of leaf isozymes in Citrus. *Jpn. J. Breed.* **37**: 377— 388.

[20] Singh, R. & Nath, N. 1969: Practical approach to the classification of citrus. *Proc. First Int. Citrus Symp.* **1**: 435— 440.

[21] Swingle, W. T. 1967: The botany of citrus and its wild relatives. In Reuther, W., L. D. Batchlor and H. J. Webber (eds): The Citrus Industry. Calif. Univ. Press, Berkeley. 190— 430.

[22] Tanaka, T. 1977: Fundamental discussion of citrus classification. *Studia Citrogia*, **14**: 1— 6.

[23] Torres, A. M., Soost, R. K. and Diedenhofen, U. 1978: leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Amer. J. Bot.* **65**(8): 869— 881.

[24] Torres, A. M., Soost, R. K. and Mau-Lastovicka, H. 1982: Citrus isozymes —— genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *J. Hered.* **73**: 335— 339.

[25] Vajellos, C. E. 1983: Enzyme activity staining. In Tanksley, S. D. & T. J. Orton (eds): Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier, Amsterdam. 469— 516.